



“Separación celular: Complementando la decisión clínica y pronóstico del paciente”

Paz Reyes Z, PhD
Especialista de Aplicaciones
BD Biosciences, Chile

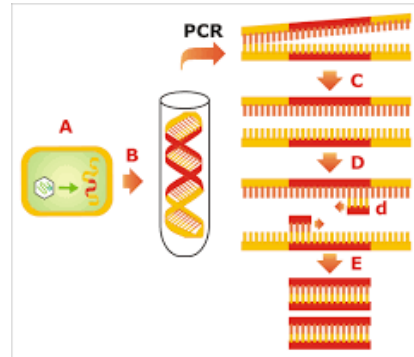
VII Curso de actualización en Oncopatología
III Taller de Citometría de Flujo
2-3 de mayo de 2019
Concepción

Técnicas actualmente utilizadas

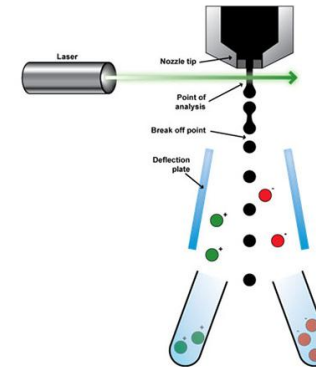
Citometría de flujo



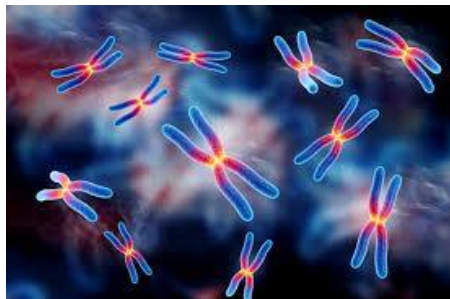
Biología molecular



Sorting de células patológicas



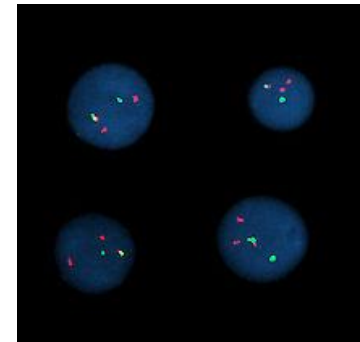
Citogenética



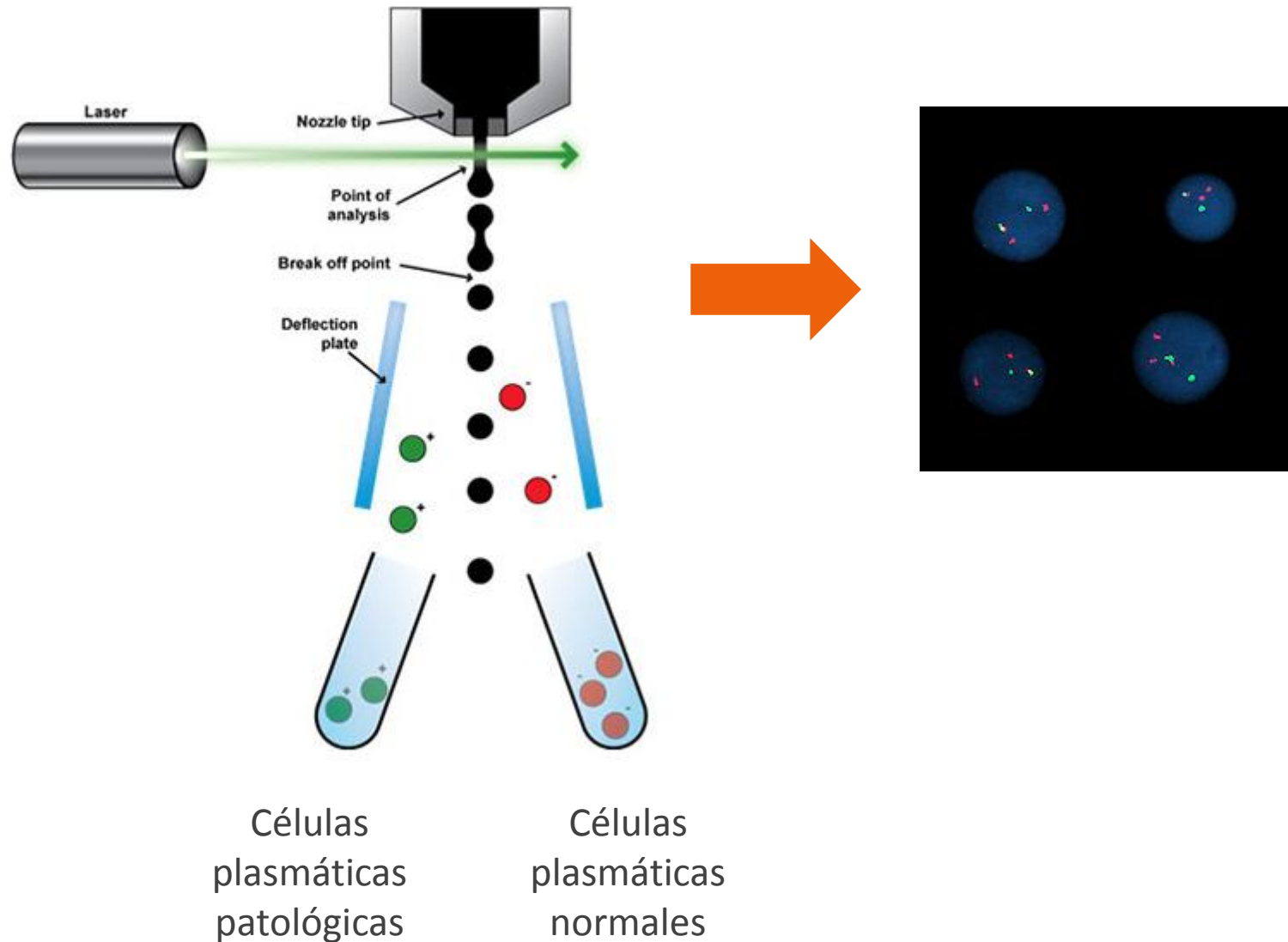
Morfología



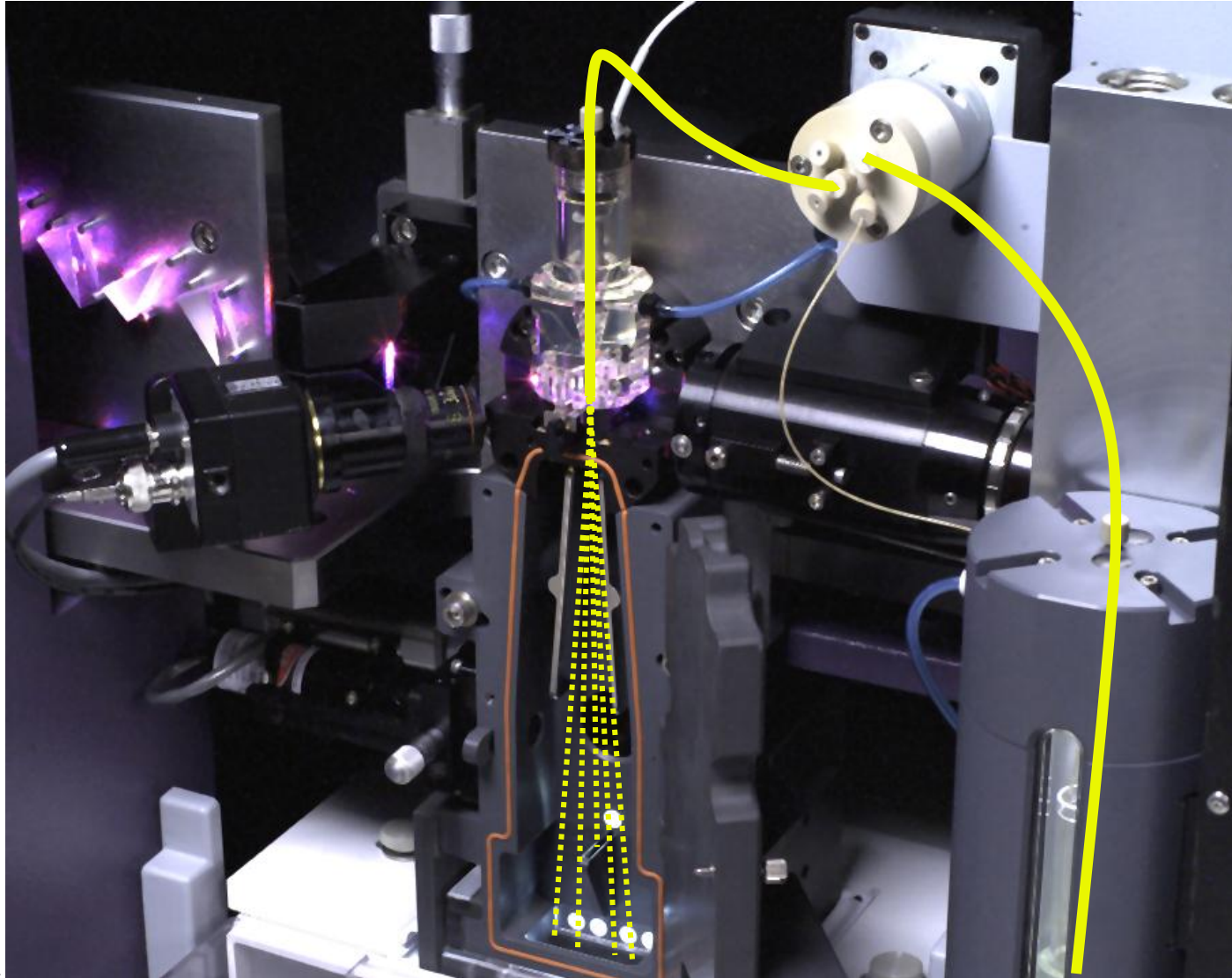
Hibridación in situ (FISH)



Sorting para hacer FISH



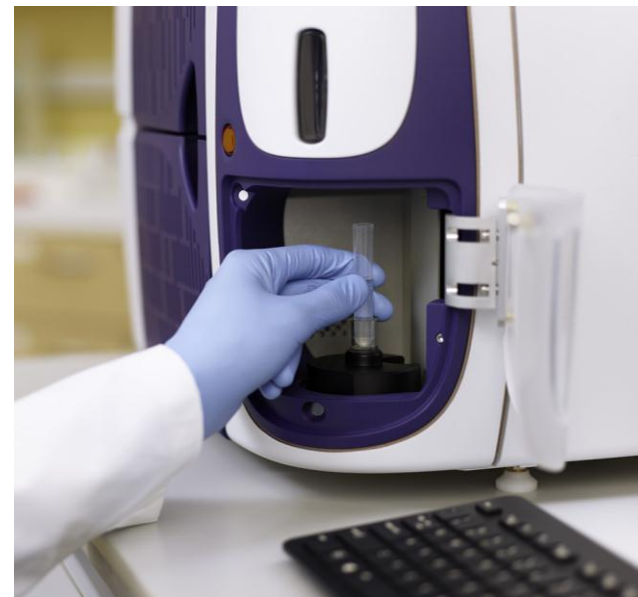
Principios de Sorting



Sorter Celular FACSMelody



- **Facilidad de uso**
todos los procesos de sorting están automatizados.
- **3 láseres 9 colores.**
- **Ajuste automático** de MFI y de compensación, **reproducibilidad** de resultados
- Las patentes y desarrollos más novedosos de BD para hacer equipo de fácil manejo
- Control de temperatura de las muestras
- Aerosol Management Option (AMO): Sistema para atrapar partículas **aerozilizadas** durante el sorting



Separación Celular

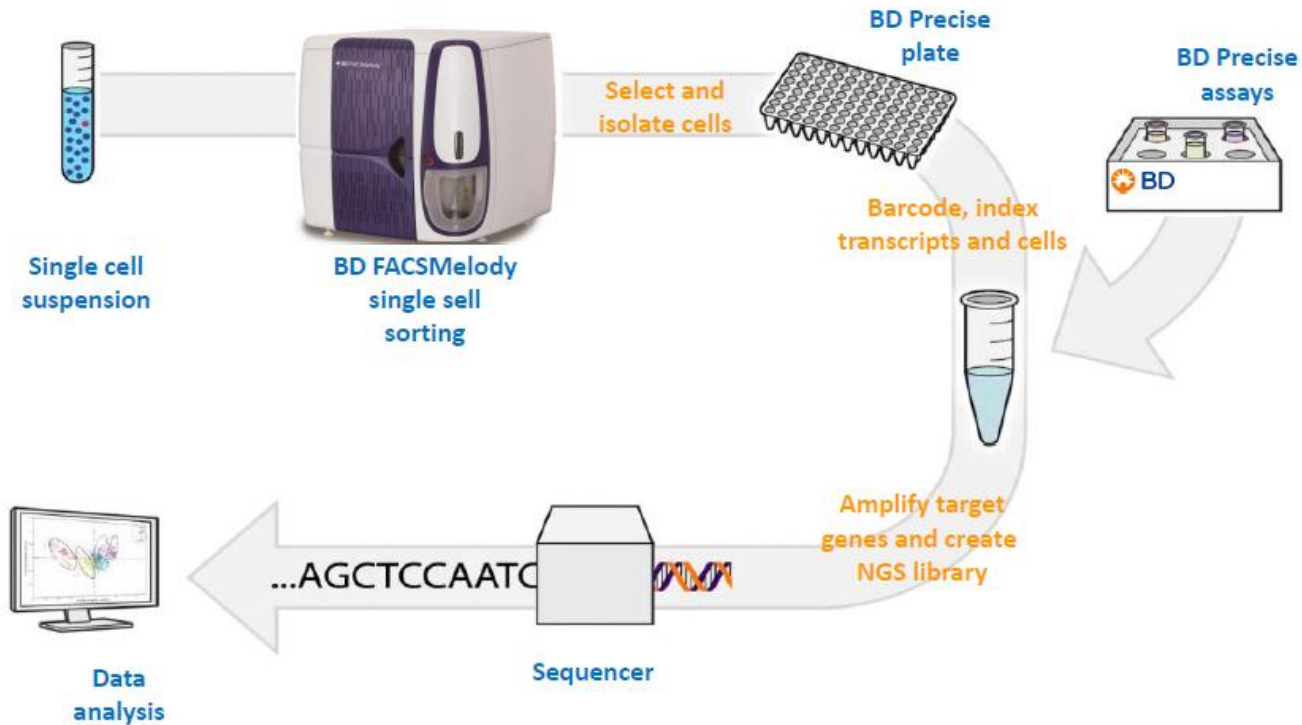
High-Throughput, Single Cell Whole Transcriptome Sequencing Analysis of Cancer Cells with the New BD FACSMelody™ Cell Sorter and BD™ Precise assay

Xiaoyang (Alice) Wang,¹ Chip Lomas,¹ Craig Betts,² Aaron Walker,² Christina Fan², Suzanne Weaver²

¹BD Biosciences, San Jose, CA, ²BD Genomics, Menlo Park, CA, United States



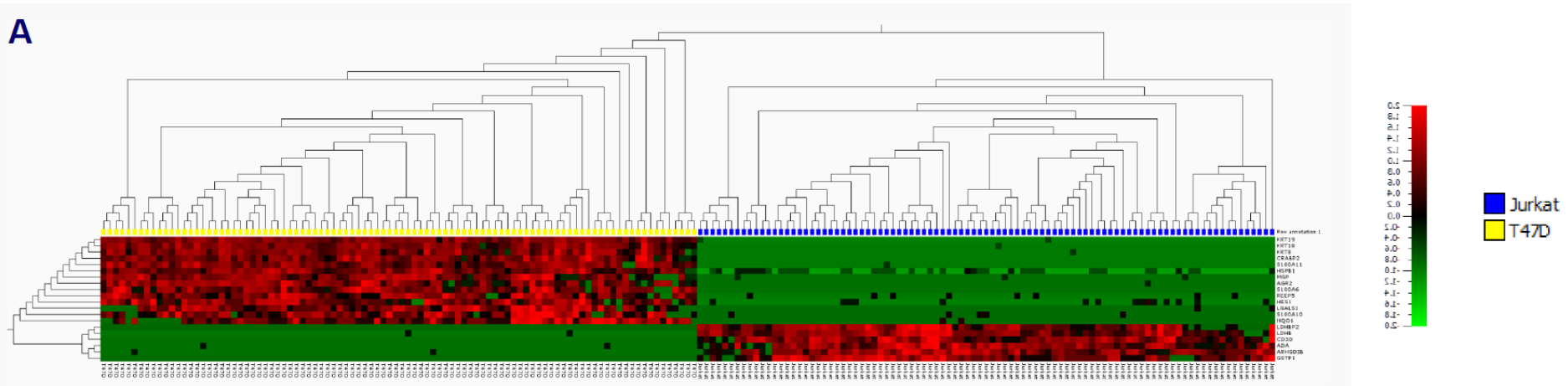
The complete workflow from single cell sorting to single cell mRNA sequencing analysis



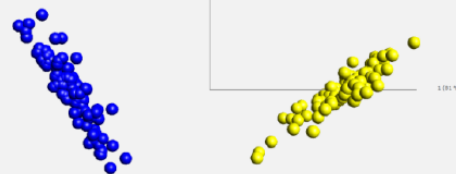
Patrón génico de cada tipo celular es particular y único

Streamlined data analysis

A



B Análisis de componente principal



■ Jurkat
■ T47D

Utilidad del sorting

Obtener poblaciones celulares específicas

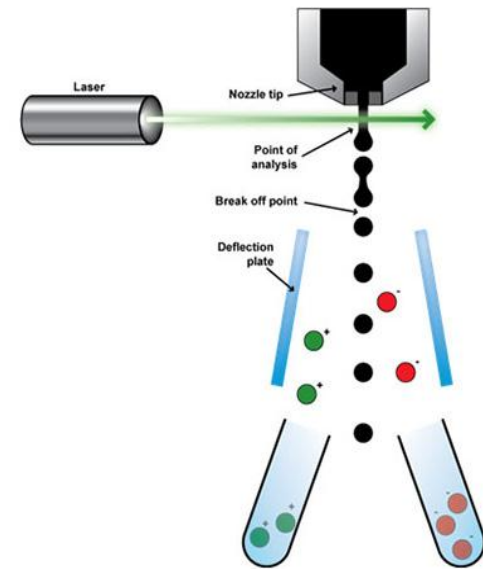
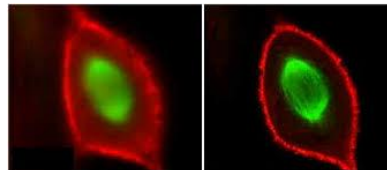


Subcultivo de las fracciones colectadas

Microscopía óptica o de fluorescencia

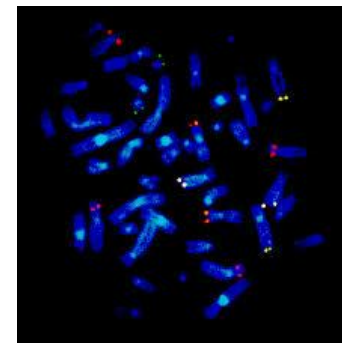
Estudios del genoma: secuenciación

FISH



Células
plasmáticas
patológicas

Células
plasmáticas
normales



Utilidad del sorting en clínica

Es útil para la evaluación del riesgo de los pacientes ya que:

- Facilita la detección traslocaciones características
- Facilita la detección de deleciones
- Da información sobre ploidía

Ej: Traslocaciones 14q32: Presentes en 50% de MGUS y en el 55-70% de los mielomas.

Panel mínimo Mieloma (IMWG):

t(4;14)(p16;q32) -----Riesgo intermedio

t(14;16)(q32;q23) -----Alto riesgo

del(17p13.1) -----Alto riesgo

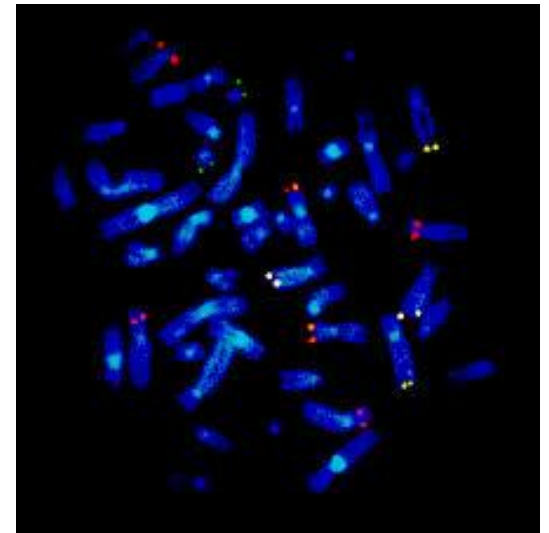
Panel más completo incluye:

t(11;14)(q13;q32) -----Riesgo standard

del 13 -----Riesgo intermedio

Categoría de ploidía -----Riesgo standard (hiperd.)/intermedio (hipodiploide)

Anormalidades del cromosoma 1



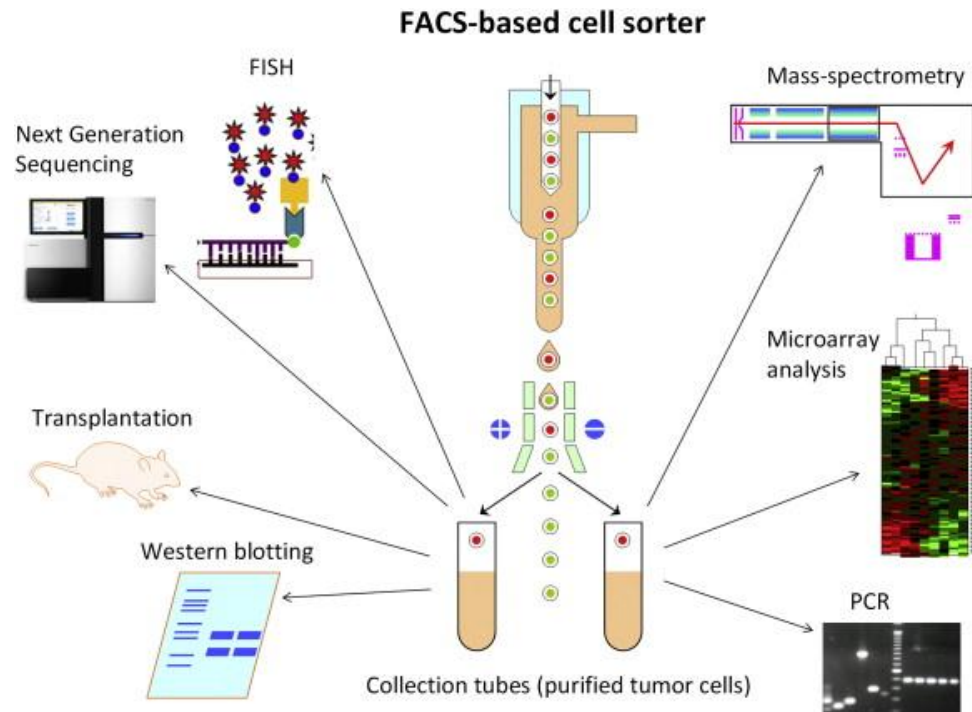
Riesgo según alteración citogenética

Table 13.12 Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy. Adapted from Chesi M and Bergsagel PL {690}

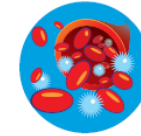
Standard risk (60%)	Intermediate risk (20%)	High risk (20%)
t(11;14)	t(4;14)	Del 17p
t(6;14)	Del 13	t(14;16)
Hyperdiploid	Hypodiploid	t(14;20)
All others		GEP high-risk signature
OS: 8–10 years	OS: 4–5 years	OS: 3 years
GEP, gene expression profiling; OS, overall survival.		

Utilidad de la separación celular

- **Aislamiento celular para estudios funcionales**
- **Aislamiento celular para estudios morfológicos**
- **Aislamiento para cultivos celulares**
- **Aislamiento para realización de técnicas moleculares:**
 - Quimerismo post- trasplantes de MO
 - Translocaciones
- **Investigación para desarrollo de protocolos de Terapia Génica**



BBACAN-87906; No. of pages: 18; 4C: 3, 4, 10



SHORT REPORT

Open Access

FISH⁺CD34⁺CD38⁻ cells detected in newly diagnosed acute myeloid leukemia patients can predict the clinical outcome

Pacientes incorporados en el estudio

Table 1 Characteristics of the 45 AML patients at diagnosis

	All patients N = 45	FISH + CD34 + CD38- <1% N = 20	FISH + CD34 + CD38- ≥1% N = 25	P value
Gender				
Male(%)	25(55.6)	10(50)	15(60)	0.557
Female(%)	20(44.4)	10(50)	10(40)	
Age, Median(range)	42(14–71)	36(19–71)	45(14–66)	0.5600
WBC, Median(range)	14.5(0.63–143)	12.4(0.63–125.24)	14.9(1.7–143)	0.9091
PLT, Median(range)	42(4–191)	28(4–191)	48(16–157)	0.198
BM blast%	58(18–96)	52.5(20–94.5)	62(18–96)	0.265
FAB subtype				0.694
M1	5	2	3	
M2	18	10	8	
M4	12	5	7	
M5	9	3	6	
M6	1	0	1	
Cytogenetics risk				0.894
Favorable	24	10	14	
Intermediate	12	6	6	
Poor	9	4	5	
FLT3 mutations (%)	5(11.1)	2(10)	3(12)	1
Allo-HSCT(%)	14(31.1)	6(30)	8(32)	1

Patients were stratified into favorable (cases with t(8;21), or inv(16), excluding complex cytogenetic), poor (cases with complex cytogenetic changes three or more unrelated abnormalities, t(6;9) or 11q23 abnormalities [excluding t(9;11)]), and intermediate (cases with t(9;11), trisomy 8, 7q-, 9q-, or trisomy 21) risk groups.

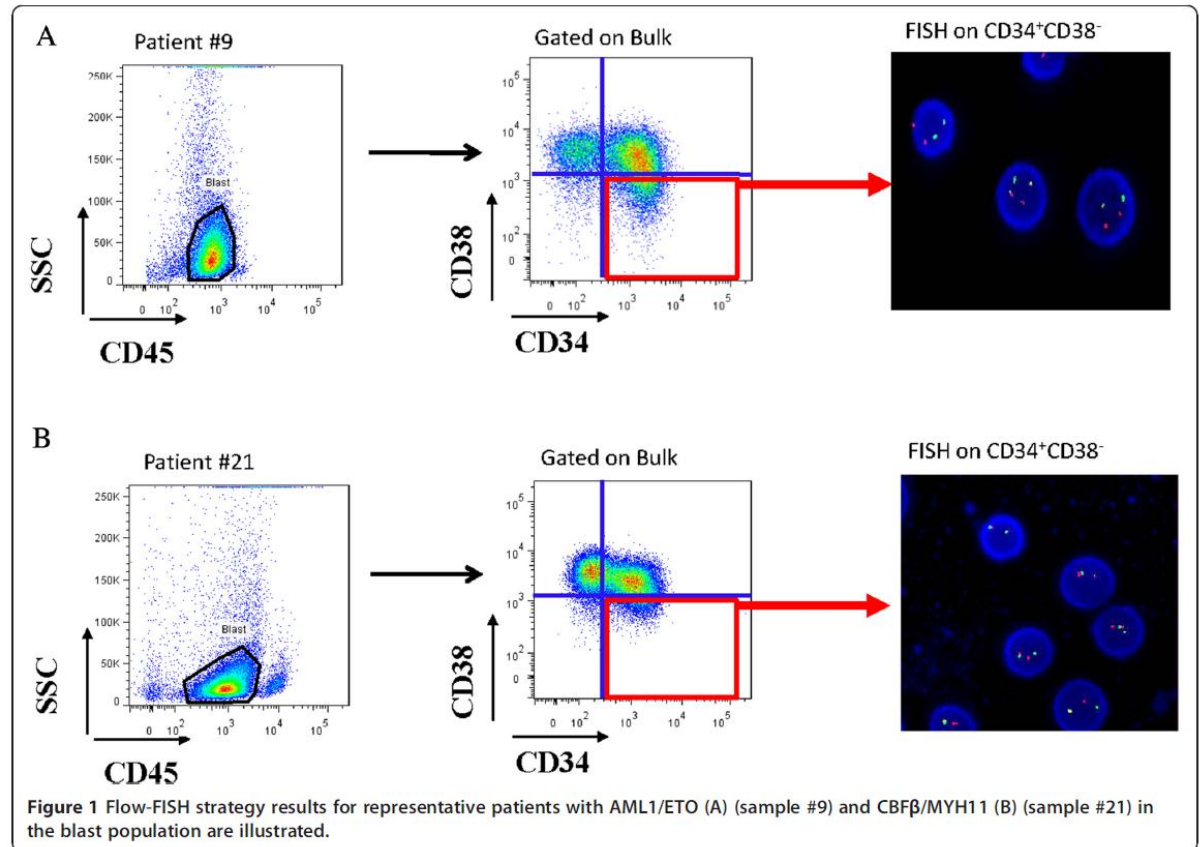
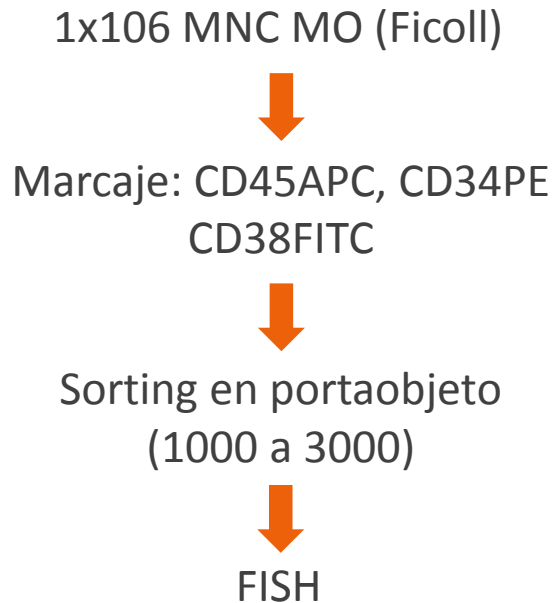
Antecedente previo

El enriquecimiento de células con un fenotipo CD34+ ó CD34+CD38- en AML al momento del diagnóstico, se ha asociado con un alto nivel de enfermedad residual después del tratamiento

Objetivo

Generar un protocolo para analizar y separar LICs (leukemia Initiating Cells) de las células normales dentro del compartimiento de células CD34+CD38- de pacientes con AML

Sorting de células LIC (leukemia Initiating Cells) desde el compartimiento de células CD34⁺CD38⁻



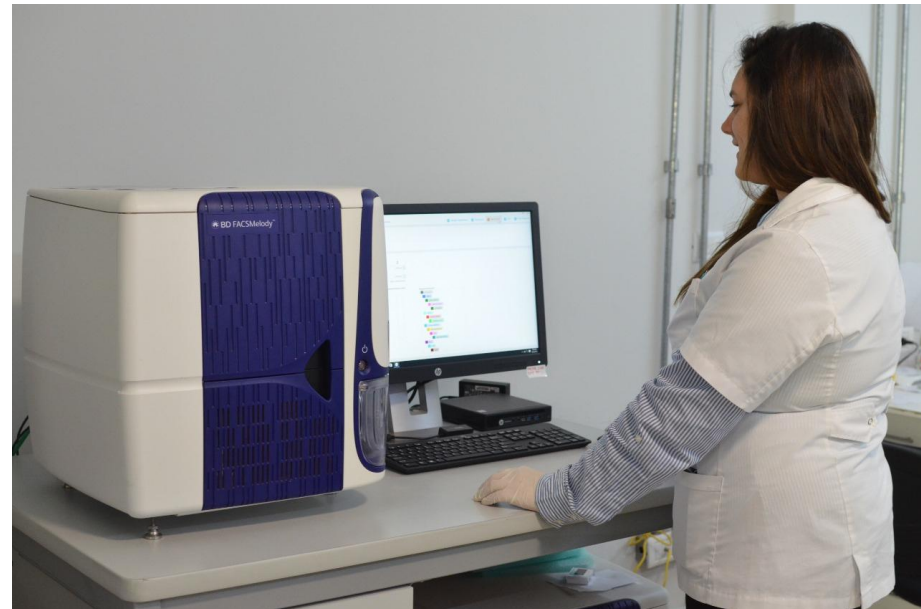
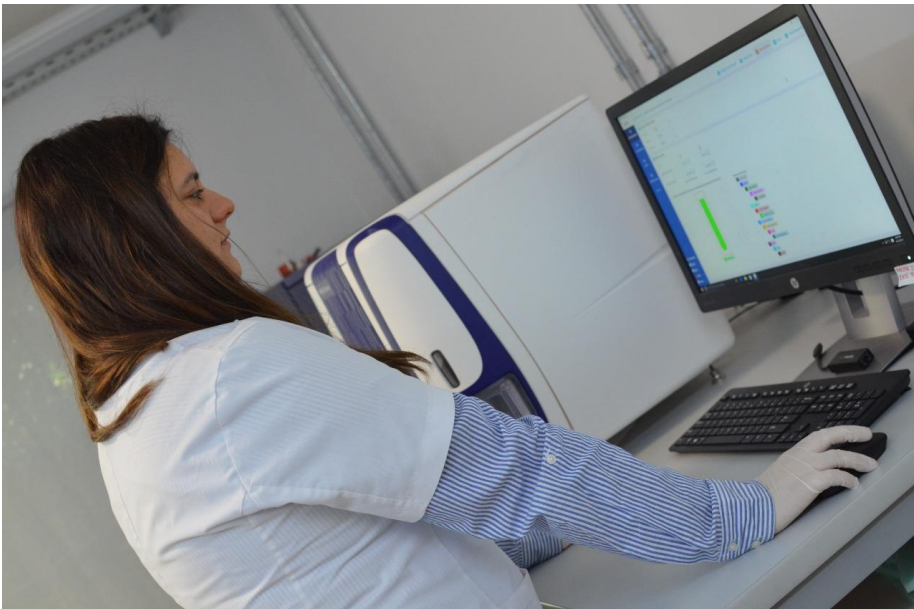
Resultados

Cuando el porcentaje de células FISH+CD34+CD38- es mayor al 1% se correlaciona fuertemente con una disminución en el promedio de supervivencia de los pacientes con AML y disminución de los pacientes sin recaída (event-free)

Protocolo Flow-FISH fue un método útil para distinguir células normales y “reales” iniciadoras de leucemia dentro de la subpoblación de células CD34+CD38-

Experiencia del laboratorio LEB en separación celular para Oncohematología utilizando el instrumento BD FACSMelody

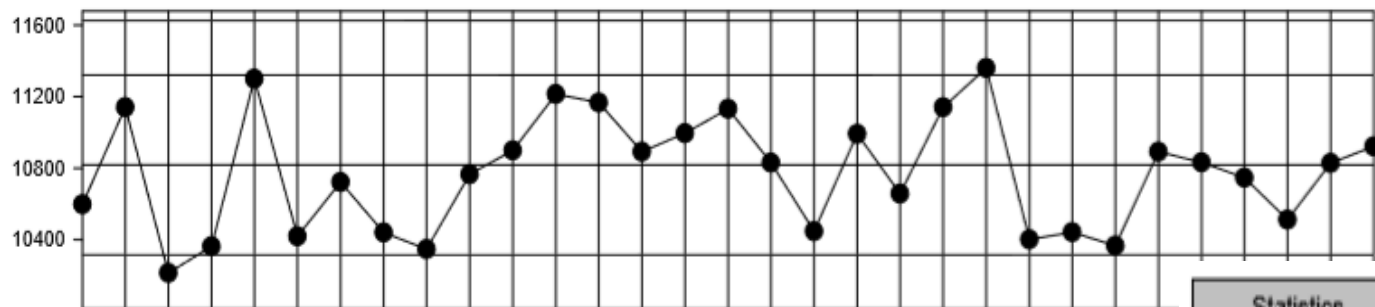
Laboratorio de Especialidades Bioquímicas
Dra Evangelina Agriello



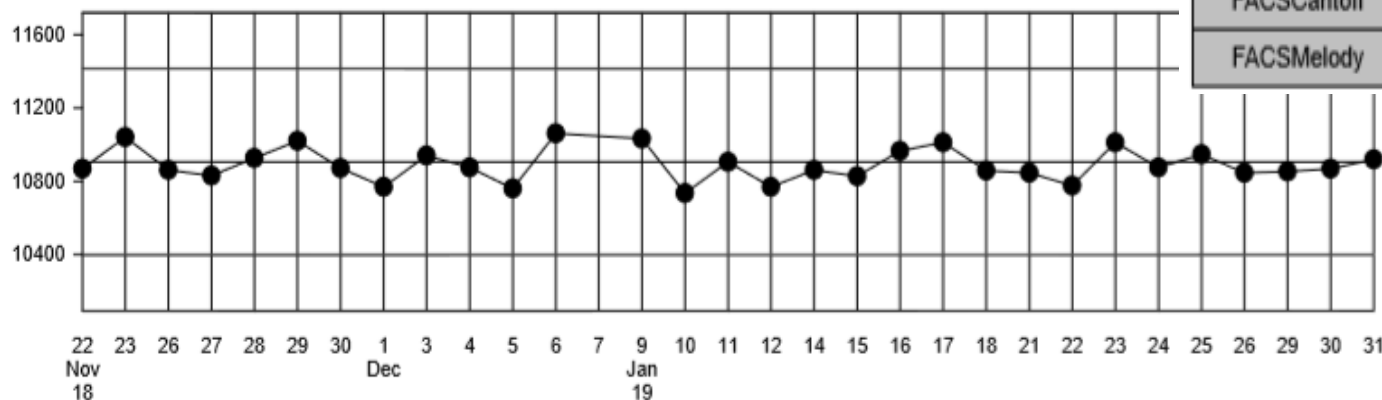
Validación de la Estandarización en BD FACSMelody

Estabilidad del sistema FITC

FACSCantoll



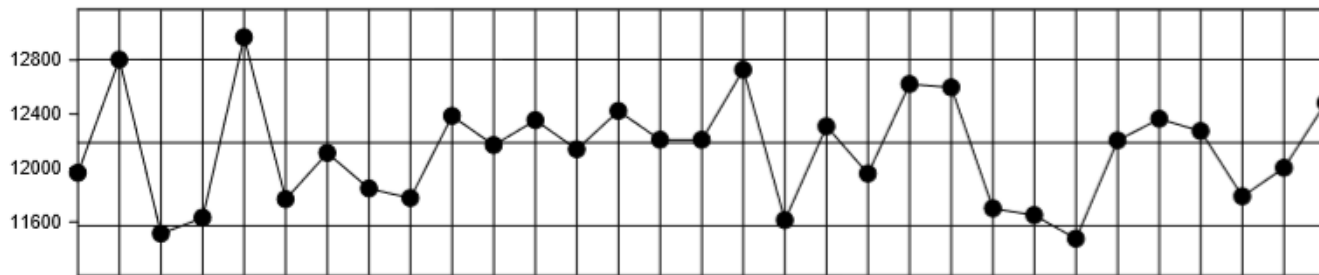
FACSMelody



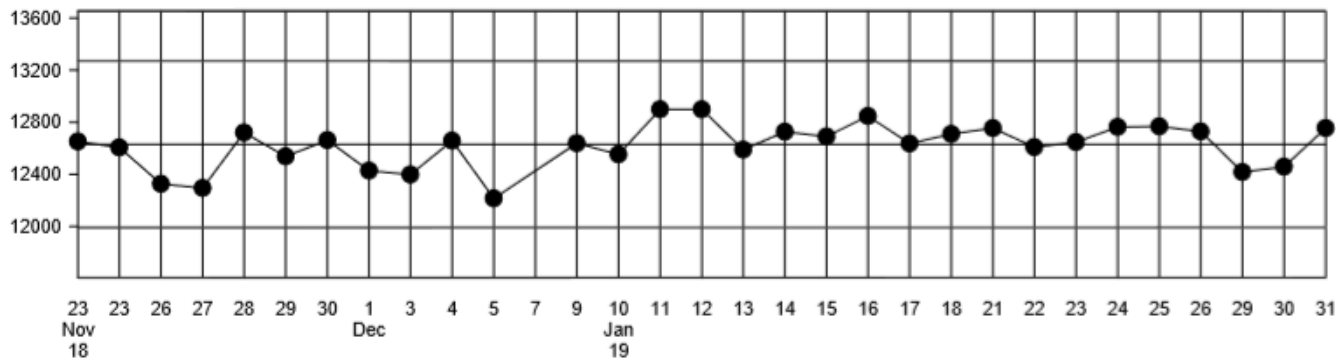
Statistics	m (MFI)	C.V. (%)
FACSCantoll	10818,6	3,2
FACSMelody	10906,2	1,0

PE

FACSCantoll



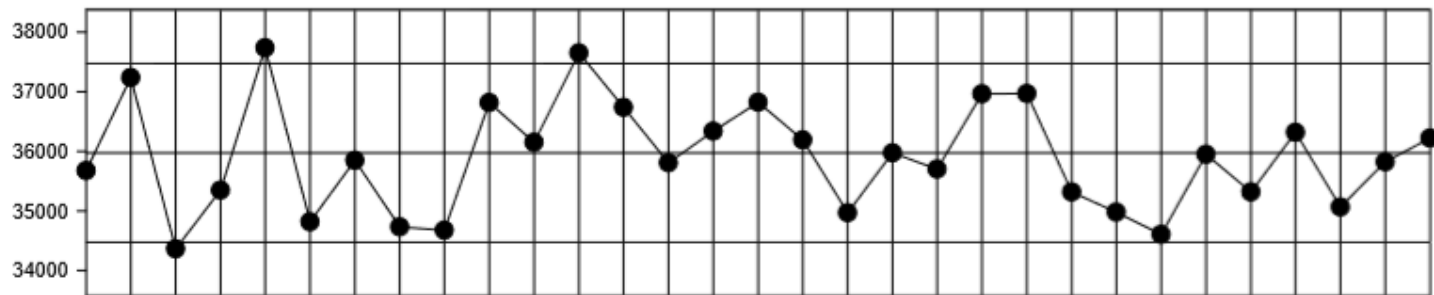
FACSMelody



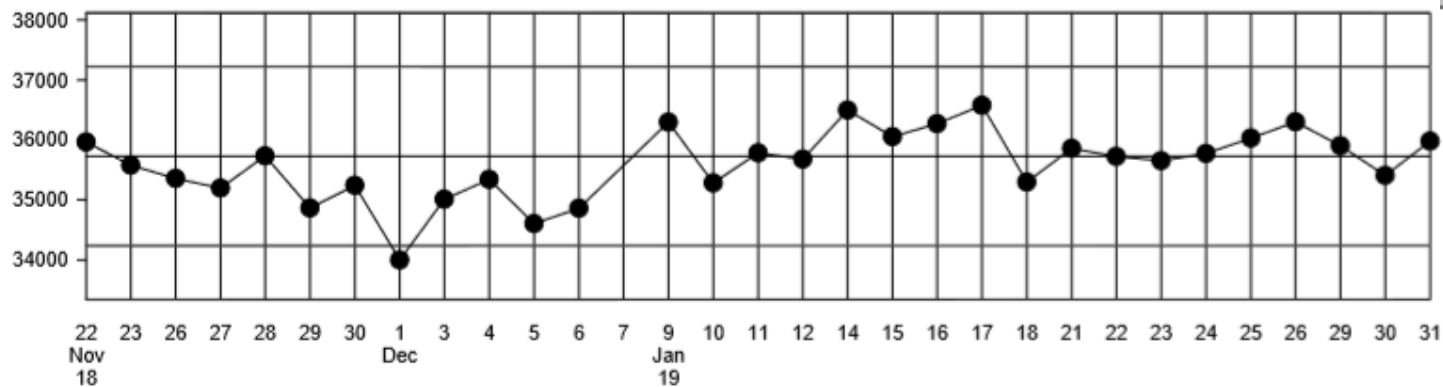
m (MFI)	C.V. (%)
12188,2	3,4
12630,5	1,3

PerCP5.5

FACSCantoll



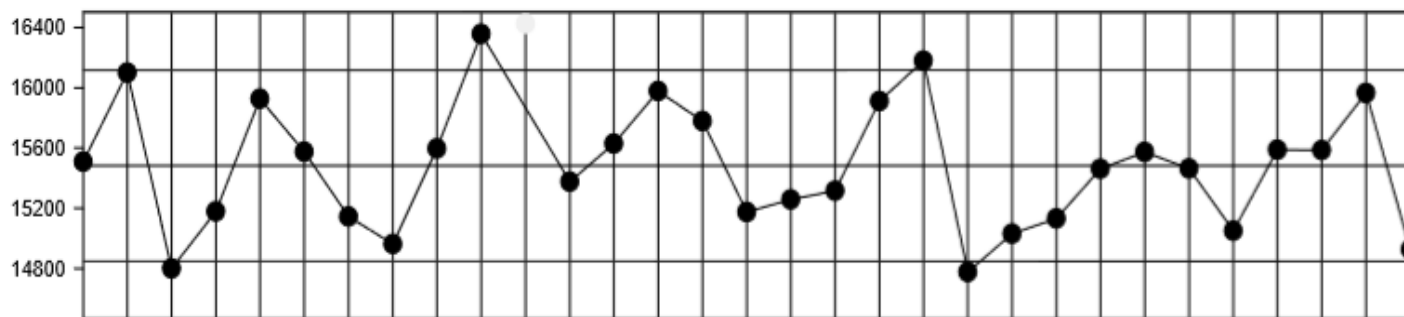
FACSMelody



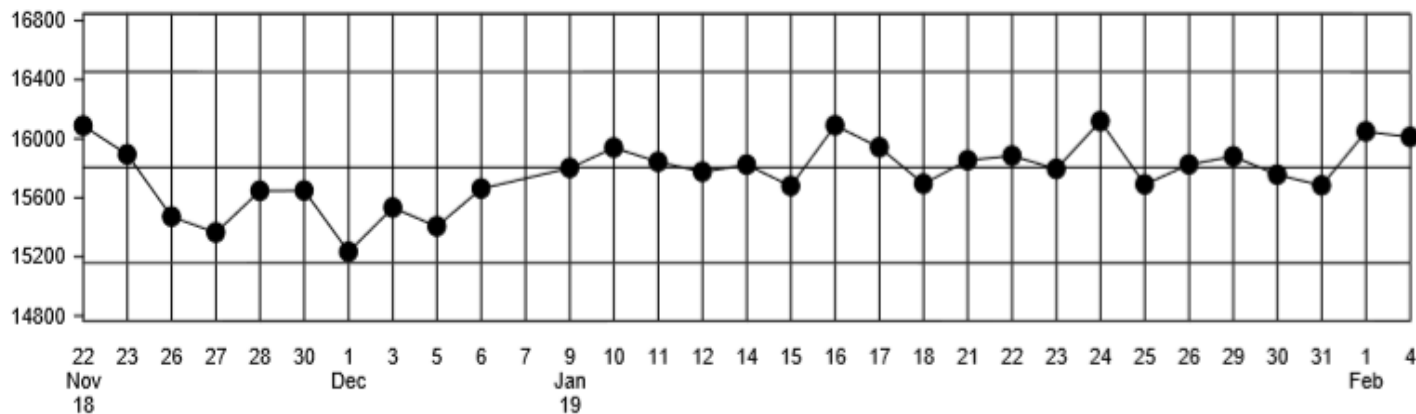
m (MFI)	C.V. (%)
35972,7	2,6
35729,6	1,4

Pe-Cy7

FACSCantoll



FACSMelody



m (MFI)	C.V. (%)
15483,0	2,7
15805,5	1,3

Preparación general de las muestras

- **Concentración y volúmenes** ($10 \cdot 10^6$ células/ml, volumen extra para crear los setting adecuados sin perder muestra para separación).
- **Filtrar** (aproximadamente 30 micras de poro).
- Preparación de **tubos de recogida**: conteniendo buffer de sorting (PBS-BSA, sin albúmina muestras para biología molecular)

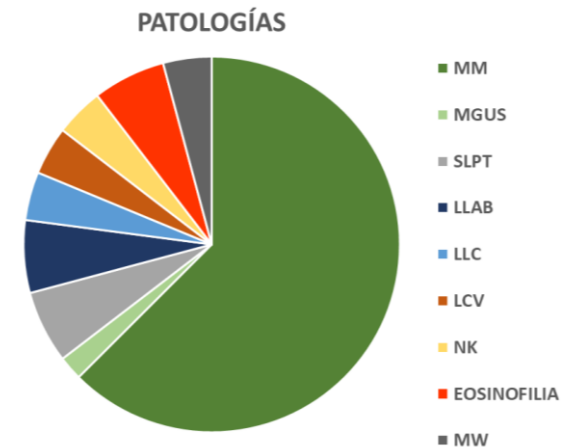


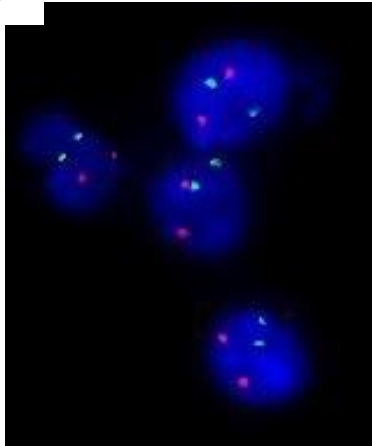
- **Pureza, Eficiencia, Recuperación**

Aplicaciones de la separación celular en el laboratorio de Hematología Clínica

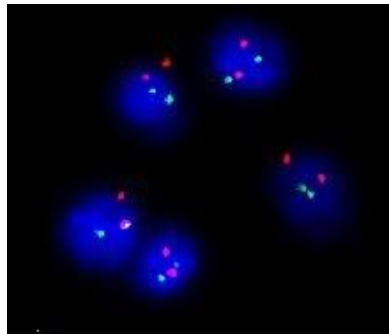
- FISH

- **Mieloma Múltiple (MM)** es una neoplasia de células plasmáticas(PC), la cual puede presentar **anomalías genómicas asociadas al pronóstico** de estos pacientes; sin embargo, la **detección** de estas mediante hibridación in situ fluorescente (FISH) puede estar **limitada por el porcentaje de PC en la muestra**.
- Las PC policlonales normalmente constituyen entre el 0,2% y el 2,2% de la médula ósea. Aunque este porcentaje aumenta en pacientes con MM, en los casos con bajo porcentaje de PC monoclonales, las células anormales pueden no detectarse durante el análisis, lo que lleva a un resultado **falso negativo**, es decir, un resultado de FISH que cae por debajo de los límites de sensibilidad de la técnica.

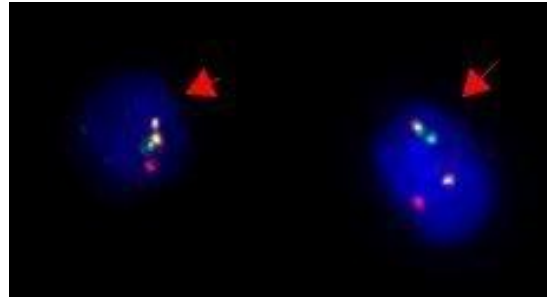




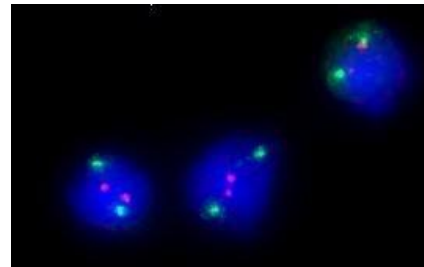
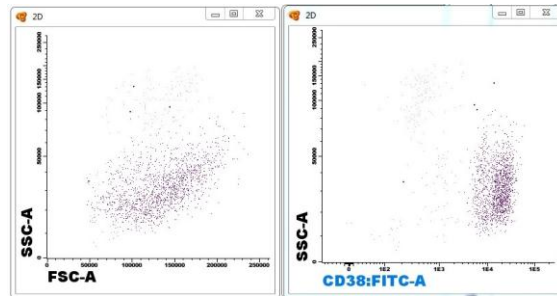
Del(1p)/Gain(1q)



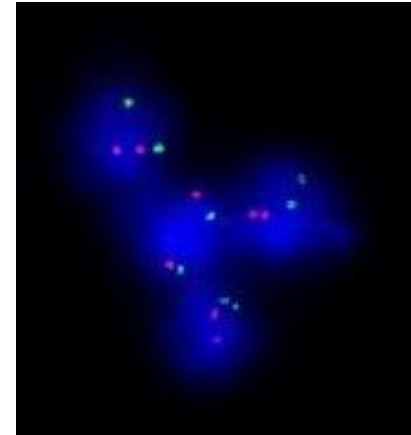
t(14;16)(q32;q23)
IGH/MAF



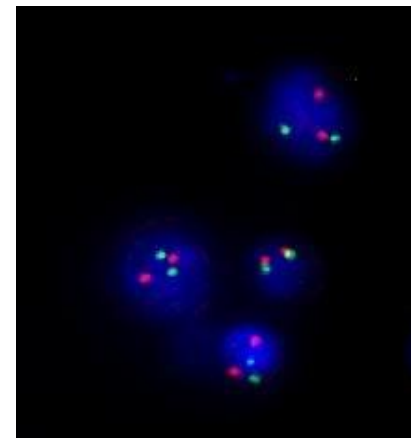
t(11;14)(q13;q32)



del(17p)/ TP53



t(14;20)(q32;q12)



Rearreglos del gen IGH (14q32)

PROTOCOLO	% CEL PAT	SORT COUNT	PATOLOGIA	TÉCNICA	PUREZA	TPO(min)	GH	IGH/IL3 t(5;14)	Del(1p)/Gain(1q)	t(11;14)	TP53	t(4;14)	t(14;16)	t(14;20)
75033	15	216.000	MM	FISH	94	56			S/R	S/R	S/R	S/R	S/R	
75094	20.2	648.000	MM	FISH	-	78		NEG			NEG			
75321	8.3	648.000	MM	FISH	49	52	POS		NEG	POS	NEG	NEG	NEG	
75566	6	648.000	MM	FISH	52	44	NEG		POS		NEG			
75595	1.5	460.471	MM	FISH	65	108	NEG		POS		NEG			
75688	7.1	648.000	MM	FISH	53	54	NEG		POS		NEG			
80049	2.35	160.280	MM	FISH	54	39					NEG	NEG	NEG	NEG
80191	6.2	297.473	MM	FISH	71	40	NEG		NEG		NEG			
80564	3	546.922	MM	FISH	43	69	S/R				S/R			
80975	0.3	200.000	MM	FISH	55	49	NEG				NEG			
80977	0.82	500.000	MM	FISH	63	83	S/R		S/R		S/R			
80992	3,1	800.000	MM	FISH	98	66			NEG		NEG	NEG		
81232	10	100.000	MM	FISH	93	25	S/R		S/R		S/R			
81559	0.039	150.000	MM	FISH	46	88	NEG				NEG			
81573	7.5	120.000	MM	FISH	62	29					NEG			
82114		50.000	MM	FISH	-	35				NEG	NEG	NEG		
82225	5.6	190.000	MM	FISH	62	31	S/R		S/R		S/R			
82274	0.87	175.000/75.000	MM	FISH	64	60	NEG		NEG		NEG			
82899	2%	90.000 todo EDTA sorteado	MM	FISH	92	100	S/R		S/R		S/R			
83228		500.000	MM	FISH	97.5				POS	NEG	NEG			

La separación celular es una tecnología que viene a complementar las técnicas del laboratorio para oncohematología a través de:

- 1- Enriquecimiento de poblaciones de baja cantidad (poblaciones patológicas)
- 2- Incrementar la sensibilidad para la detección de alteraciones citogenéticas
- 3- Permitir generar correlaciones entre la citogenética y la sobrevida del paciente



“Separación celular: Complementando la decisión clínica y pronóstico del paciente”

Gracias!

